

猪繁殖与呼吸综合症病毒分离株 ORF5 和 Nsp2 基因的序列分析

康艳梅, 赵明秋, 张学涛, 沈海燕, 徐艳芳, 琚春梅, 易琳, 陈金顶

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:根据美洲型猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)基因组序列设计2对引物,对疑似 PRRSV 感染猪的病料进行 RT-PCR 检测,核酸检测阳性病料进行 PRRSV 分离,获得了1株美洲型 PRRSV,命名为 GD08-2.对 PRRSV GD08-2 株、GD-XH 株、GD08-1 株的 ORF5 基因和部分 Nsp2 基因进行序列测定与分析.结果表明, GD08-2 株的 ORF5 基因与 PRRSV 疫苗株 pMLV、经典株 VR-2332 和 GD-XH 株的相似性较高,而与 GD08-1 株的相似性较低. GD08-2 株的 Nsp2 基因推导的氨基酸序列出现12个氨基酸的不连续缺失,分别位于66~74位和192~194位,由此推测, GD08-2 株可能为 PRRSV 的突变株. GD08-1 株的 ORF5 基因与国内分离的高致病性 PRRSV 相似性较高,其 Nsp2 基因推导的氨基酸序列存在30个氨基酸的缺失,与国内高致病性 PRRSV 分离株 JXA1 的缺失位置完全一致,由此推测, GD08-1 株属于高致病性 PRRSV; GD-XH 株的 ORF5 基因与疫苗株 pMLV 的相似性较高,其 Nsp2 基因存在个别核苷酸的点缺失.遗传进化分析表明, GD08-1 株与国内分离的高致病性 PRRSV 的遗传进化关系较近,属同一分支; GD-XH 株和 GD08-2 株与 PRRSV 经典株 VR-2332、疫苗株 pMLV 的遗传关系较近,属另一分支.

关键词:猪繁殖与呼吸综合症病毒; ORF5 基因; Nsp2 基因; 序列分析

中图分类号: S852.659.6; Q522.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)02-0108-05

Isolation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Sequence Analysis of ORF5 and Nsp2 Genes

KANG Yan-mei, ZHAO Ming-qiu, ZHANG Xue-tao, SHEN Hai-yan,

XU Yan-fang, JU Chun-mei, Yi Lin, CHEN Jin-ding

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two pairs of primers were designed and synthesized according to genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) available. The tissues of swine were detected by a RT-PCR method. Virus had been isolated and identified from the tissue whose detection turned to be positive. All the results indicated that the virus isolated was American PRRSV, which was designed GD08-2. ORF5 and Nsp2 genes of GD-XH, GD08-1 and the isolated strain GD08-2 were amplified, cloned and sequenced respectively. The results showed that ORF5 gene of GD08-2 had high similarity with PRRSV pMLV, PRRSV VR-2332 and GD-XH strain, but a little low with GD08-1. The discontinuous deletions of 12 amino acids were found at sites 66-74 and 192-194 in the peptide deduced from the Nsp2 gene. The results showed that the GD08-2 strain might be the deletion mutant isolate of PRRSV. The ORF5 gene of GD08-1 shared highly similarity with highly pathogenic PRRSV strains. The deletions of 30 amino acids in GD08-1 strain was consistent with the highly pathogenic PRRSV JXA1 strain. The results showed that the GD08-1 strain might be highly pathogenic PRRSV. The ORF5 gene of GD-XH strain shared highly similarity with PRRSV pMLV, and there were some deletions in the Nsp2 gene of GD-XH. Phylogenetic analysis showed that GD08-1 strain had the closest relationship with highly pathogenic PRRSV strains, and be-

收稿日期: 2009-10-15

作者简介: 康艳梅(1983—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 陈金顶(1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: jdchen@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目(2007A020300064, 2008B02060003); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(TRT0723); 广东省自然科学基金创新团队项目(5200638)

longed to the same group, while GD08-2 strain and GD-XH strain were attributed to another group with PRRSV pMLV and VR-2332.

Key words: PRRSV; ORF5 gene; Nsp2 gene; sequence analysis

猪繁殖与呼吸综合症(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合症病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪的一种高度接触性传染病.其主要症状表现为妊娠母猪的流产、死胎、木乃伊胎等繁殖障碍,以及各种年龄猪(特别是仔猪)的呼吸道症状.根据基因型和抗原型的差异可将 PRRSV 分为 2 个亚型,即美洲型(以 VR-2332 为代表株)和欧洲型(以 LV 为代表株)^[1-2].欧洲型 PRRSV 主要流行于欧洲地区,而美洲型 PRRSV 主要流行于美洲和亚太地区^[3].在我国,1996 年郭宝清等^[4]在暴发流产的胎儿中分离到 PRRSV.2006 年夏秋之季,我国又发生了由 PRRSV 变异株引起的一种猪高致病性蓝耳病,仔猪发病率达 100%,死亡率达 50% 以上,母猪流产率达 30% 以上,育肥猪也可发病死亡,给我国养猪业造成了巨大损失^[5-6].本研究对从广东地区某发病猪场分离出的 1 株 PRRSV GD08-2 及华南农业大学兽医学院微生物与免疫学实验室保存的另 2 株 PRRSV GD-XH、GD08-1 的 ORF5 基因和 Nsp2 基因进行序列测定及分析,以期对 PRRSV 的流行演化规律研究及防控奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病料 采自广东某规模化猪场疑似 PRRSV 感染猪的肺脏和淋巴结.

1.1.2 细胞及毒株 细胞 Marc-145、PRRSV 毒株 GD-XH、GD08-1 由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存.

1.1.3 引物的设计及合成 根据 GenBank 中 PRRSV 的基因序列分别设计了用于扩增 ORF5 和 Nsp2 变异区基因的引物.引物序列分别如下:ORF5-F: 5'-ATGTTGGAGAAATGCTTGACC-3', ORF5-R: 5'-CTAAGGAGGACCCCATTTGTTTC-3', 预期扩增大小为 603 bp; Nsp2-F: 5'-CAGCGACTTCAGAAATGAT-3', Nsp2-R: 5'-GCATGTCAACCCTATCCCAC-3', 预期扩增经典毒株和缺失变异株大小分别为 870 bp 和 780 bp, 以上引物均由上海生工生物工程公司合成.

1.2 方 法

1.2.1 病毒的分离 取 1 g 疑似 PRRSV 病死猪组织病料加 10 mL 生理盐水制成组织匀浆,加青霉素、链霉素各 2 000 U/mL,反复冻融 3 次,离心取上清

液,上清液过滤后接种培养至 75% 以上 Marc-145 单层细胞,37 °C 吸附 1 h,吸去病料滤液后补加 DMEM 完全培养液继续培养,每天观察 2 次细胞的生长情况,如未出现细胞病变则于 72 h 后进行盲传.并对每代的细胞培养物进行 RT-PCR 检测.

1.2.2 病毒 RNA 的抽提 参照 TRIzol Reagent 试剂说明书抽提 PRRSV 的总 RNA.

1.2.3 病毒 ORF5 基因与 Nsp2 变异区基因的 RT-PCR 扩增 以抽提的病毒 GD08-1 株、GD08-2 株、GD-XH 株的 RNA 为模版,用六核苷酸随机引物作为反转录引物,在 AMV 反转录酶作用下,合成 cDNA 第一链.再以合成的 cDNA 为模板,分别用各自的上下游引物进行 PCR 扩增.

1.2.4 基因的克隆、序列测定与分析 将 PCR 产物回收纯化后分别克隆入 pMD18-T 载体,选取阳性重组质粒,送上海生工生物工程公司进行序列测定.对 GD08-1 株、GD08-2 株、GD-XH 株的 Nsp2、ORF5 基因序列与 GenBank 中注册的 PRRSV(表 1)进行分析.

表 1 参考毒株信息

Tab. 1 Details of strains in the alignment

毒株	登录号	年代	来源国家
pMLV	EF484033	2008	USA
VR-2332	DQ217415	2001	USA
CH-1a	AY032626	2001	China
HB-1(sh)/2002	AY150312	2004	China
JXA1	EF112445	2007	China
HUN4	EF635006	2007	China
GD2007	EU880433	2009	China
HB-2(sh)/2002	AY262352	2004	China

2 结 果

2.1 病毒分离

用疑似 PRRSV 的病料组织液接种 Marc-145 细胞,盲传 2 代后出现明显的细胞病变.细胞培养物经 RT-PCR 检测为 PRRSV 核酸阳性,将该培养物命名为 GD08-2.

2.2 ORF5 基因及 Nsp2 基因的 RT-PCR 扩增及序列测定

对 PRRSV GD08-2 株、GD-XH 株、GD08-1 株的 ORF5 基因与 Nsp2 变异区基因进行 RT-PCR 扩增.结果显示,三者的 ORF5 基因扩增片段大小约为 603 bp, Nsp2 变异区基因扩增片段大小约 800 bp, 均与目的条带大小符合.对获得的基因片段分别进行克隆

与序列测定,获得了 PRRSV GD08-2 株、GD-XH 株、GD08-1 株的 ORF5 基因和 Nsp2 变异区基因序列。

2.3 ORF5 基因的序列分析

2.3.1 ORF5 基因的核苷酸序列分析 对 PRRSV GD08-2 株、GD-XH 株和 GD08-1 株的 ORF5 序列分析显示, GD08-1 株 ORF5 基因序列与 GD-XH 株和 GD08-2 株的相似性分别为 89.5% 和 89.7%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性较高, 分别为 99.7%、99.8% 和 99.0%; 与 PRRSV 普通株 CH-1a、HB-1(sh)2002 和 HB-2(sh)2002 相似性分别为 95.3%、96.8% 和 92.5%; 与 PRRSV 经典毒株 VR-2332 的相似性为 89.3%, 与疫苗株 pMLV 的相似性为 89.2%。GD08-2 株的 ORF5 基因与 GD-XH 株的相似性较高, 为 99.8%, 与经典株 VR-2332 和疫苗株 pMLV 的相似性也较高, 分别为 98.7% 和 99.2%; 与 PRRSV 普通株 CH-1a、HB-1(sh)2002 和 HB-2(sh)2002 相似性为 91.8%、88.8% 和 89.0%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性分别为 89.3%、89.5% 和 88.8%。GD-XH 株与经典株 VR-2332 和疫苗株 pMLV 的相似性较高, 分别为 98.5% 和 99.0%; 与 PRRSV 普通株 CH-1a、HB-1(sh)2002 和 HB-2(sh)2002 相似性分别为 91.7%、88.7% 和 88.8%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒

株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性分别为 89.3%、89.2% 和 88.7%。

2.3.2 ORF5 基因的推导氨基酸序列分析 本研究所测得的 3 株 PRRSV ORF5 基因序列推导出的氨基酸序列均存在点突变, 没有缺失(图 1)。GD08-1 株与 GD-XH 株和 GD08-2 株的相似性分别为 87.5% 和 88.0%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性较高, 分别为 99.5%、100% 和 98.5%; 与 PRRSV 普通株 CH-1a、HB-1(sh)2002 和 HB-2(sh)2002 相似性为 93.5%、94.5% 和 91.5%; 与 PRRSV 经典毒株 VR-2332 的相似性为 88.5%, 疫苗株 pMLV 的相似性为 87.5%。GD08-2 株与 GD-XH 株的相似性较高, 为 99.5%, 与经典株 VR-2332 和疫苗株 pMLV 的相似性分别为 97.5%、98.5%; 与普通株 CH-1a、HB-1(sh)2002 和 HB-2(sh)2002 相似性为 91.0%、88.5% 和 89.0%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性分别为 87.5%、88.0% 和 86.5%。GD-XH 株与经典株 VR-2332 和疫苗株 pMLV 的相似性较高, 分别为 97.0% 和 98.0%; 与普通株 CH-1a、HB-1(sh)2002 和 HB-2(Ash)2002 相似性为 90.5%、88.0% 和 88.5%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4、GD2007 的相似性分别为 87.0%、87.5% 和 86.0%。

Table with 2 rows of amino acid sequences. The first row shows positions 10-100 and the second row shows positions 110-200. Strains listed include VR-2332, pMLV, CH-1a, HB-1(sh)2002, HB-2(sh)2002, HUN4, JXA1, GD2007, GD08-1, GD08-2, and GD-XH.

图 1 ORF5 基因推导的氨基酸序列分析

Fig. 1 Comparison of the deduced amino acid sequence of ORF5 gene with PRRSV strains

2.3.3 ORF5 的遗传进化分析 遗传进化分析表明(图 2), GD08-2 株与 GD-XH 株、疫苗株 pMLV 和经典株 VR-2332 的遗传关系较近, 同属于 PRRSV 美洲

株, 而与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 等遗传关系较远。GD08-1 则与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和

GD2007 的遗传关系较近。

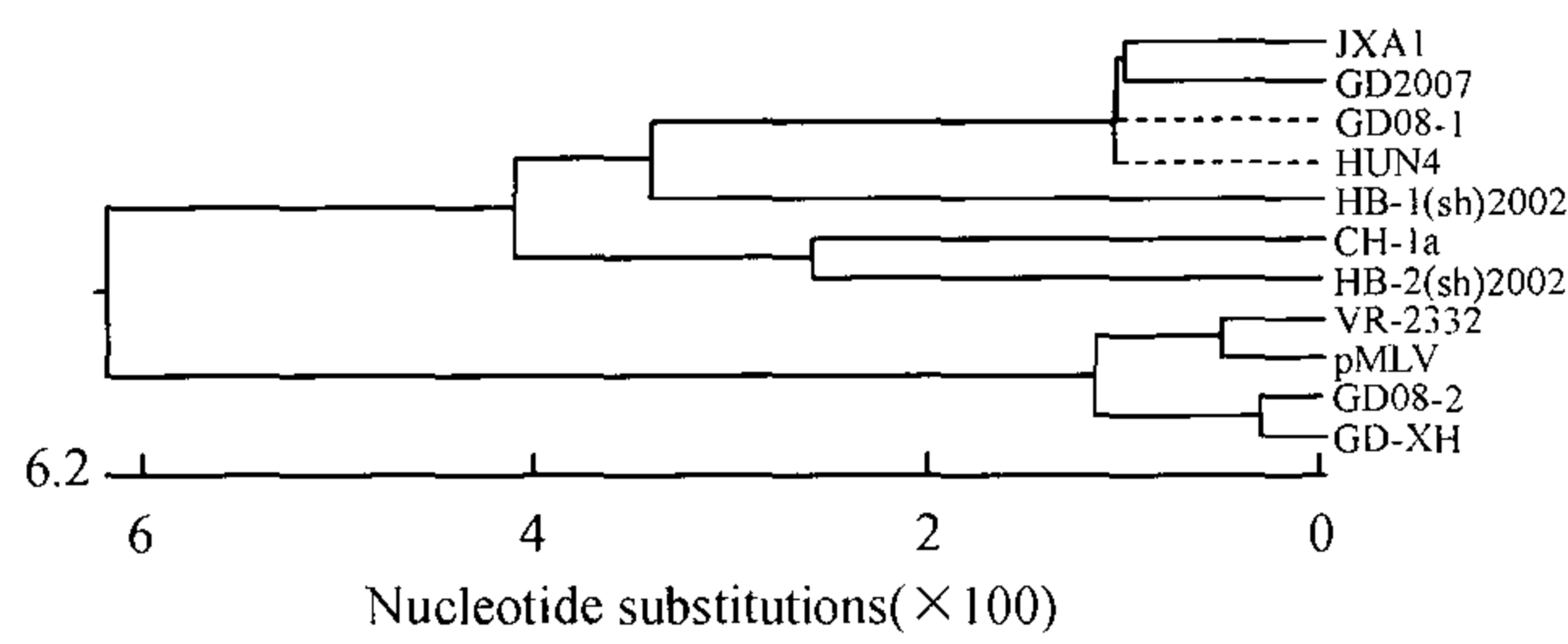


图 2 ORF5 基因的核苷酸进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the ORF5 gene

2.4 Nsp2 变异区基因的序列分析

2.4.1 Nsp2 变异区基因的核苷酸序列分析 序列分析结果表明, GD08-2 的 Nsp2 基因序列与 PRRSV 经典毒株相比缺失 36 个核苷酸. GD08-2 与疫苗株 pMLV 的相似性最高, 为 95.1%; 与经典株 VR2332 的相似性为 94.9%; 与普通株 CH-1a、HB-1 (sh) 2002 和 HB-2 (sh) 2002 的相似性为 79.6%、76.1% 和 77.7%; 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性为 77.1%、76.8% 和

77.0%. GD-XH 株与 GD08-2 的相似性较高, 达 98.0%; 与 GD08-1 株的相似性为 79.0%. 毒株 GD08-1 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性较高, 达 99.4%、99.1% 和 99.2%.

2.4.2 Nsp2 基因的推导氨基酸序列分析 与普通 PRRSV 相比, GD08-2、GD-XH 和 GD08-1 3 株的 Nsp2 基因推导的氨基酸序列变异较大(图 3), 不但存在点突变还存在不同部位缺失, 其中 GD08-2 的 Nsp2 分别在第 66 ~ 74 位和第 192 ~ 194 位, 共缺失 12 个氨基酸, 但其与 VR2332 和 pMLV 株等相似性较高, 达 94.5% 和 94.8%, 除缺失外, 仅存在少数点突变; GD08-1 的 Nsp2 与经典毒株相比, 存在 27 个氨基酸的缺失, 位于 132 ~ 160 位, 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4 和 GD2007 的相似性较高, 达 90.4%、89.6% 和 90.7%. GD-XH 株存在一些点突变, 其氨基酸序列与 VR2332 和 PRRSV pMLV 的相似性较高, 分别为 87.9% 和 87.6%, 与分离株 GD08-2 的相似性为 87.8%, 与 GD08-1 相似性较低, 为 59.8%.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
HB-1 (sh) 2002	QATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVDPNGSEDLTVGGPLNFPPTSEPMTMSE										
HB-2 (sh) 2002	QATSEMMALAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPKVQPRRMKPKVSLPENKVPVAPRRKVRSDPGKSILA-----VGGPLNFSTPSELVTPPLGE										
HUN4	QATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEGKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVDPNGSEE-TVGGPLNFPPTSEPMTMSE										
JXA1	QATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEGKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVDPNGSEE-TVGGPLNFPPTSEPMTMSE										
GD2007	QATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEGKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVDPNGSEE-TVGGPLNFPPTSEPMTMSE										
GD08-1	QATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPRVQPRRTKSVKSLPGGKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVDPNGSEE-TVGGPLNFPPTSEPMTMSE										
GD08-2	QATSEMMAWAVEQVDLKTWVKNYPRWTWPPPPPKVQPRKTKPKVSLPERKVPVAPRRKVRSDCGSPVSLGGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSE										
GD-XH	QATSEMMAWAVEQVDLKTWVKNYPRWTWPPPPPKVQPRKTKPKVSLPERKVPVAPRRKVRSDCGSPVSLGGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSE										
pMLV	QTTSDMMAWAVEQVDLKTWVKNYPRWTWPPPPPKVQPRKTKPKVSLPERKVPVAPRRKVRSDCGSPVSLGGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSE										
VR-2332	QTTSDMMAWAVEQVDLKTWVKNYPRWTWPPPPPKVQPRKTKPKVSLPERKVPVAPRRKVRSDCGSPVSLGGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSE										
CH-1a	QATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRTWPPPPPRVQPRKTKPKVSLPENKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVDPNGWEDFAVGGPLDFPTSEPMTPLSE										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
HB-1 (sh) 2002	PVLTPALQVRPKLMTPLDGSAPVAPRRRTVSRPMTPLSEPIFLSAPRHKQVQVEEANPATTTLTHQNEPLDLSASSQTEYEASPLASSQNMMSILEAGGQE										
HB-2 (sh) 2002	PVLMPASQHVSRPVTPLSEPAVPAVAPRRIVSRPMTPLSEPTFVAPWRKSSQVVEEANPAAATLTCQDEPLDLSASSQTEYEAYPLAPLENIGVLEAGGQE										
HUN4	PVLMPASRRVPKLMTPLSGSAPVAPRRRTVT-----TTLTHQDEPLDLPASSQTEYEAFPLAPSQNMMSILEAGGQE										
JXA1	PVLVPASRRVPKLMTPLSGSAPVAPRRRTVT-----TTLTHQDEPLDLSASSQTEYEAFPLAPSQNMMSILEAGGQE										
GD2007	PVLVPASRRVPKLMTPLSGSAPVAPRRRTVT-----TTLTHQDEPLDLSASSQTEYEAFPLAPSQNMMSILEAGGQE										
GD08-1	PVLVPASRRVPKLMTPLSGSAPVAPRRRTVT-----TTLTHQDEPLDLSASSQTEYEAFPLAPSQNMMSILEAGGQE										
GD08-2	LVIVSSPQCIFRPATPSSEPAPIAPRGTVSRPVTPLSEPIVPAVAPRRKQVQVRLSSAAAIIPPYQNEPLDLSASSQTEYEASPPAPPQSG---GVEGHE										
GD-XH	LVIVSSPQCIFRPATPLSEPAPIAPRGTVSRPVTPLSEPIVPAVAPRRKQVQVRLSSAAAIIPPYQNEPLDLSASSQTEYEASPPAPPQSGGVLGVEGHE										
pMLV	LVIVSSPQCIFRPATPLSEPAPIAPRGTVSRPVTPLSEPIVPAVAPRRKQVQVRLSSAAAIIPPYQNEPLDLSASSQTEYEASPPAPPQSGGVLGVEGHE										
VR-2332	LVIVSSPQCIFRPATPLSEPAPIAPRGTVSRPVTPLSEPIVPAVAPRRKQVQVRLSSAAAIIPPYQNEPLDLSASSQTEYEASPPAPPQSGGVLGVEGHE										
CH-1a	PVLMPASQHIRPVTPLSGPAPVAPRRRTVSRPMTPLSEPIFVSAPRHKQVQVEEANPAAATLTYQDEPLDLSAFSQTECEASPLAPLQNMMSILEAGGQE										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290		
HB-1 (sh) 2002	AEEVLSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-KEKEACL SIMREACDASKLSDPATQEWLSRMWDRVDM										
HB-2 (sh) 2002	AEEVLSGISDILDNTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-KEKEACL RIMREACDAARLGD PATQEWLSHMWDRVDV										
HUN4	VEEVLSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-KEKEACL SIMREACDASKLGD PATQEWLSRMWDRVDM										
JXA1	VEEVLSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-KEKEACL SIMREACDASKLGD PATQEWLSRMWDRVDM										
GD2007	VEEVLSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-KEKEACL SIMREACDASKLGD PATQEWLSRMWDRVDM										
GD08-1	VEEVLSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRITRKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQQRKKKHAASACVRLVMRPS-LVILLRRVALS-HVDRVDM										
GD08-2	AEETLSEISDMSGNIKPASVSSSSSLSSVRITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-EVKETCL SVMREACDATKLDD PATQEWLSRMWDRVDM										
GD-XH	AEETLSEISDMSGNIKPASVSSSSSLSSVRITRPKYSAQAIIIDSGGPAVG-IS-RGKGNMP. CHAGGM. CD. ADDSATQNGFPRMVG. GDM										
pMLV	AEETLSEISDMSGNIKPASVSSSSSLSSVRITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-EVKETCL SVMREACDATKLDD PATQEWLSRMWDRVDM										
VR-2332	AEETLSEISDMSGNIKPASVSSSSSLSSVRITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-EVKETCL SVMREACDATKLDD PATQEWLSRMWDRVDM										
CH-1a	AEEVLSGISDILDNTNPAPVSSSSSLSSVRITRPKYSAQAIIIDSGGPCSGHLQ-REKEACL SIMREACDAAKLSD PATQEWLSRMWDRVDM										

图 3 Nsp2 基因推导的氨基酸序列分析

Fig. 3 Comparison of the deduced amino acid from Nsp2 gene with PRRSV strains

2.4.3 遗传进化分析 结果(图4)表明,分离毒株 GD08-2 与 GD-XH 株及疫苗株 MLV、PRRSV 经典毒株 VR2332 的遗传关系较近,而与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4、GD2007 等遗传关系较远. GD08-1 则与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 JXA1、HUN4、GD2007 等遗传关系较近.

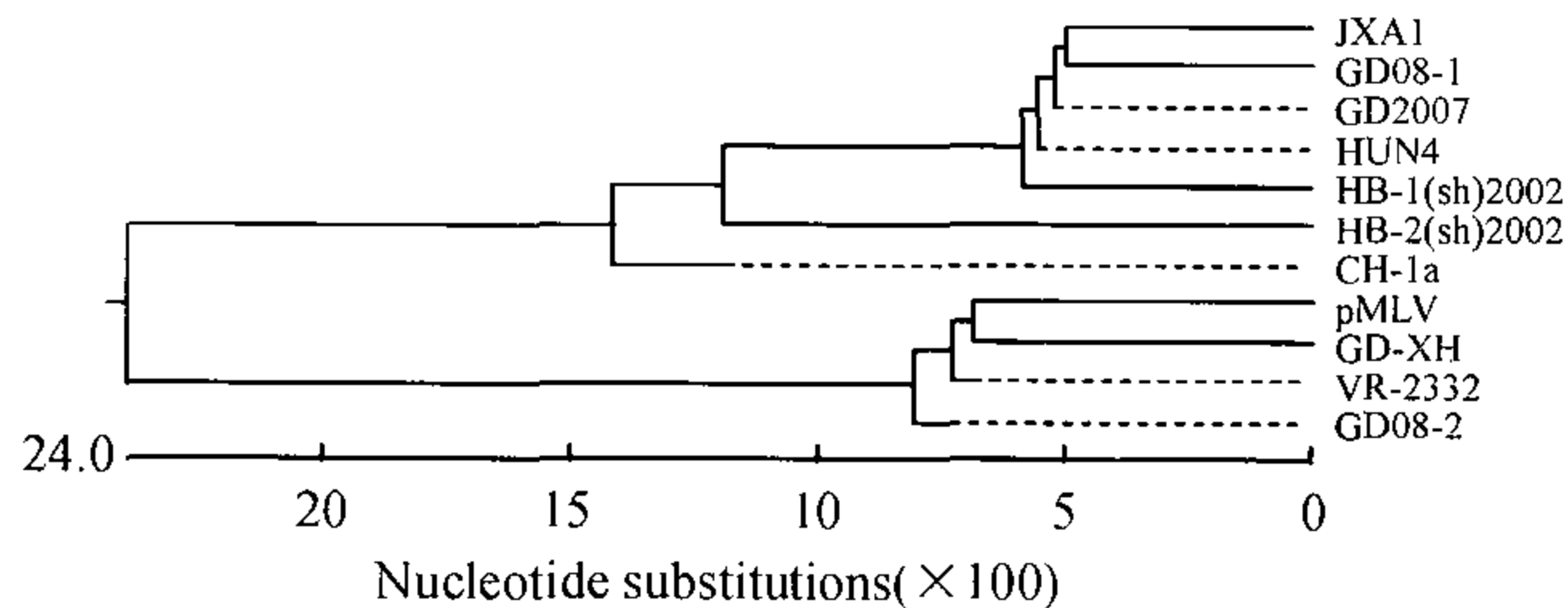


图4 Nsp2 基因的核苷酸进化分析

Fig.4 Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the Nsp2 gene

3 结论

PRRSV 各分离株基因组序列存在不同程度的差异. 不同地域分离株基因组序列分析显示, PRRSV 有 2 种基因型——美洲型(以 VR2332 为代表株)和欧洲型(以 LV 为代表株), 欧洲型分离株间的差异较小, 北美洲型分离株间的差异相对较大. 目前, 国内外已经完成多株 PRRSV 的全基因组序列测定^[7-8], 序列分析的结果表明, PRRSV 的变异分布于整个基因组, 尤以 ORF5 基因和 Nsp2 基因的变异最大^[9-10]. 因此, 对这 2 个基因变异的分析在一定程度上可以反映病毒基因组序列变异的情况, 在研究上常作为比较 PRRSV 变异的靶基因.

ORF5 基因编码的 E 蛋白是 PRRSV 中变异性较大的结构蛋白, 一般同种基因型间 ORF5 基因推导的氨基酸序列的相似性为 88% ~ 99%, 而欧洲型与美洲型 PRRSV 间的氨基酸相似性仅有 52% ~ 55%. 序列分析表明, 本研究 3 株 PRRSV 的 ORF5 基因序列没有缺失, 与经典毒株相比, 仅有几个碱基的突变. 另外, 根据 Wesley 等^[11] 报道, 对 ORF5 基因的 RT-PCR 产物用 *Mlu* 内切酶进行 RFLP 分析, 可以区分疫苗株与野毒株. 这是因为疫苗株的第 137 位氨基酸为 Ala, 野毒株则为 Ser. 本研究的 GD08-2 及 GD-XH 株的 ORF5 基因的氨基酸序列与 PRRSV pMLV, VR2332 相同, 第 137 位氨基酸为 Ala, 而 GD08-1 株的 ORF5 基因的氨基酸序列则为 Ser, 为野毒株特征.

近几年来, 弱毒疫苗在一些养猪国家广泛使用, 易造成 PRRS 的暴发. Nielsen 等^[12] 研究发现, 用减毒活疫苗免疫仔猪后, 从同场的未免疫母猪的胎儿、死产猪、死亡仔猪体内可分离到疫苗来源的病毒, 这种病毒感染妊娠后期的母猪会导致死胎, 增加断奶仔猪的死亡率. 据此, 疫苗使用后病毒很容易发生变异, 这些变异毒株也是猪场发生 PRRS 的原因之一.

对 GD08-2 株的 Nsp2 基因的序列分析表明, 虽然其与经典毒株 VR-2332 和疫苗株 pMLV 的相似性较高, 但是该毒株的 Nsp2 基因存在 36 个核苷酸的缺失, 推测该毒株为 PRRSV 经典株或疫苗株的变异株. GD-XH 株的 Nsp2 基因存在个别核苷酸缺失, 推测其可能为美洲型 PRRSV. GD08-1 株则为高致病性 PRRSV.

参考文献:

- [1] DEA S, GAGNON C A, MARDASSI H, et al. Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein[J]. Clin Microbiol, 1996, 34(6): 1488-1493.
- [2] MURTAUGH M P, ELAM M R, KAKACH L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus[J]. Arch Virol, 1995, 140: 1451-1460.
- [3] FORSBERG R, STORGAARD T, NIELSEN H S, et al. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe[J]. Virology, 2002, 299: 38-47.
- [4] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1996(2): 1-4.
- [5] TIAN Ke-gong, YU Xin-ling, ZHAO Tie-zhu, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PloS ONE, 2007, 2(6): 5:-6.
- [6] LI Yu-feng, WANG Xing-long, BO Kun-tao, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China[J]. Vet J, 2007, 174(3): 577-584.
- [7] CHEON D S, CHAE C. Antigenic variation and genotype of isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea[J]. Vet Rec, 2000, 147(8): 215-218.
- [8] KAPUR V, ELAM M R, PAWLOVICH T M, et al. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States[J]. J Gen Virol, 1996, 77(6): 1271-1276.
- [9] MATEU E, DIAZ I. The challenge of PRRS immunology [J]. Vet J, 2008, 177(3): 345-351.
- [10] MATEU E, DIAZ I, DARWICH L, et al. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005[J]. Virus Res, 2006, 115(2): 198-206.
- [11] WESLEY R D, MENGELING W L, LAGER K M, et al. Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5[J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10: 104-144.
- [12] NIELSEN J, BOTHER A, BILLE-HANSEN V, et al. Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus[J]. Vet Microbiol, 2002, 84(1/2): 1-13.

【责任编辑 柴 焰】